

TARTU ÜLIKOOL
Sporditeaduste ja füsioteraapia instituut

Lauri Õnnik

Skeletilihaste taastumise dünaamika glükokortikoidsest müopaatiast

Dynamics of skeletal muscle regeneration from glucocorticoid induced myopathy

Magistritöö

Kehalise kasvatuse ja spordi õppekava

Juhendajad:

Prof. P. Kaasik

PhD K. Alev

Tartu 2016

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
TÖÖ LÜHIÜLEVAADE	4
ABSTRACT	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Glükokortikoidse lihasatroofia iseloomustus	6
1.2 Glükokortikoidide selektiivne mõju	6
1.3 Glükokortikoidsete hormoonide antianaboolne mõju	8
1.4 Glükokortikoidide kataboolne mõju	8
1.5 Müopaatia kujunemise dünaamika glükokortikoidide lühiajalisel manustamisel	9
1.6 Glükokortikoidide mõju inhibeerimine	10
2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED	12
3. METOODIKA	13
3.1 Katseloomad	13
3.2 Deksametasooni manustamine	13
3.3 Histoloogilised uuringud	14
3.4 Müofibrillaarvalkude eraldamine ja MHC isovormilise kompositsiooni määramine	14
3.5 Statistika	15
4. TÖÖ TULEMUSED	16
4.1 Muutused kehamassis glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel ning mõjustamise järgsel taastumisel	16
4.2 Lihase massi ja kehamassi suhte dünaamika glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel ning mõjustusest taastumisel	16
4.3 Lihaskiudude ristlõikepindalade muutused glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel	18
4.4 Glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamise ja selle järgse taastumise mõju MHC kompositsioonile	20
4.5 Tuumapopulatsioon glükokortikoidse müopaatia tingimustes	21
ARUTELU	23
JÄRELDUSED	26
KASUTATUD KIRJANDUS	27
LIHTLITSENTS	30

KASUTATUD LÜHENDID

Akt – proteiinkinaas B

FOXO – kahvlipea boksi geen , gupp 0 (*forkhead box gene, group 0*)

GC – glükokortikoid (*glycocorticoid*)

hPTH – inimese paratüroidhormoon (*human parathyroid hormone*)

IGF-I – insuliini sarnane kasvufaktor I (*insuline like growth factor I*)

MHC – müosiini rasked ahelad (*myosin heavy chain*)

MLC – müosiini kerged ahelad (*myosin light chain*)

mTOR – rapamütsiini sihtmärk imetajates (*mechanistic target of rapamycin*)

MuRF-1 – (*muscle ring finger protein 1*)

NaCl – naatrium kloriid

SDS-PAAG – naatrium dodetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeel

TG - triglütseriidid

VLDL-TG – väga madala tihedusega lipoproteiin – triglütseriidide kompleks (*very low density lipoprotein – triglycerid*)

TÖÖ LÜHIÜLEVAADE

Eesmärk: Töö eesmärgiks oli välja selgitada skeletilihaskoe müopaatia kujunemise eripära ja müopaatilise skeletilihaskoe taastumise dünaamika.

Metoodika: Uuringus kasutati 20 emast täiskasvanut Wistar liini rott, kes jagati juhuslikkuse aluse nelja gruppi – kontrollgrupp (K), glükokortikoididega mõjustatud grupp (GC) ja glükokortikoididega mõjustatud + taastunud grupid (GC-T 10 päeva ja GC-T 20 päeva). GC ja GC-T (10 ja 20 päeva) grupi loomadele manustati kõhuõõnde süstimise teel deksametasooni (50 µg deksametasooni/100 g kehamassi kohta) kümne päeva vältel, peale manustamise lõppu jäid GC-T grupid vastavalt 10 ja 20 päevaks taastuma. Pärast loomade ohverdamist eemaldati ning kaaluti tagajäsemete lihased (*m. soleus*, *m. plantaris*, *m. extensor digitorum longus*, *m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius*). *M. plantaris*'t analüüsiti histoloogiliselt ja *m. plantaris*'e MHC isovormiline kompositsioon määrati elektroforeetiliselt.

Tulemused: Pärast viie päevast deksametasooni manustamist langes katseloomade kehamass oluliselt ($p < 0,05$). Kehamass langes kogu deksametasooniga manustamise perioodi vältel. Viie päevase taastumise järel oli kehamass oluliselt ($p < 0,05$) tõusnud ning jätkas tõusu kogu 20 päevase taastumise perioodi vältel, kuid ei saavutanud algtaset. *M. plantaris*'es leiti olulised muutused ($p < 0,05$) MHC isovormide suhtelises sisalduses. Muutusi rakutuumade hulga ja lihaskiu ristlõikepindala suhtarvus gruppide vahel ei ilmnenu.

Kokkuvõte: Lihase massi ja kehamassi suhe ei muutunud glükokortikoidse müopaatia tingimustes kiirete lihaste, kuid tõusis aeglase lihase (*m. soleus*) puhul. See on loogiline tulemus, kuna aeglase lihaskiudude ristlõikepindala ei muutunud ning MHC aeglase isovormi suhteline sisaldus ei muutunud glükokortikoididega mõjustamise tulemusel *m. plantaris*'es. Samas langes kiirete lihaskiudude ristlõikepindala ning toimus oluline nihe MHC kiirete isovormide suhtelises sisalduses, mis saavutas 20 päevase taastumise perioodi järel algtaseme. MHC isovormilise kompositsiooni taastumist *m. plantaris*'es 20 päevase perioodi jooksul võib seostada konstantse rakutuumade ja lihaskiu ristlõikepindala suhtega gruppide vahel.

Märksõnad: skeetilihas, glükokortikoidne müopaatia, lihaskiudude ristlõikepindala, MHC isovormid, taastumine

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to clarify the peculiarities of the formation of skeletal muscle myopathy and the dynamics of recovery from that myopathy.

Methods: 20 adult female Wistar strain rats used in the experiment, were divided into four groups – control (C), glucocorticoid group (GC) and glucocorticoid + recovery groups (GC-T). The GC and GC-T (10 and 20 days) group animals received intraperitoneal injections of dexamethasone (50 µg dexamethasone/100 g body mass) for ten days after which the GC-T groups were left to recover for 10 or 20 days. Hindlimb muscles (*m. soleus*, *m. plantaris*, *m. extensor digitorum longus*, *m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius*) were extracted and weighed. *M. plantaris* was analyzed using histological methods and the composition of MHC isoforms was determined electrophoretically.

Results: After five days of injections a significant loss of body mass was found ($p < 0.05$). The decline in body mass continued throughout the period of dexamethasone administration. After five days of recovery significant gain of body mass ($p < 0.05$) was measured and the increase in body mass continued until the 20th day of recovery, but did not reach the baseline value. Significant changes ($p < 0.05$) in the relative content of MHC isoforms were found in *m. plantaris*. There were no changes in the ratio of nuclei to muscle fiber cross sectional area between groups.

Conclusions: Ratio between muscle mass to body mass did not change in glucocorticoid induced myopathy in fast-twitch muscles, but increased in slow-twitch muscle (*m. soleus*), which is a logical outcome since the cross sectional area of type I muscle fibers did not change and neither did the MHC I isoform relative content. However there was a significant shift in MHC II isoforms composition in *m. plantaris* which returned to baseline values during recovery. The normalization of MHC II isoforms composition during recovery may be attributed to the constant ratio of nuclei to muscle fiber cross sectional area throughout the experiment.

Keywords: Glucocorticoid myopathy, MHC isoforms, recovery, skeletal muscle, cross sectional area

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Glükokortikoidse lihasatroofia iseloomustus

Glükokortikoidsete hormoonpreparaatide manustamisel muutub skeletilihasrakkudes nii müofibrillaarsete kui ka sarkoplasmaatiliste valkude ainevahetus, mille tulemusena langeb valgusisaldus mõlema suurema lihasvalkude fraktsiooni puhul. Langus valgusisalduses kutsub mõjustatud lihastes esile lihasrakkude atroofia (Seene ja Alev, 1985). Glükokortikoididest põhjustatud lihasatroofiat iseloomustab glükolüütiliste ehk II tüüpi lihaskiudude atroofia, mis väljendub lihaskiudude ristlõike pindala vähenemises ja vähenenud müofibrillaarsete valkude sisalduses lihaskius (Schakman et al., 2008). Lühiajaline kõrgedoosiline steroidide manustamine võib viia akuutse steroidse müopaatia tekkimiseni. Patoloogilised karakteristikud hõlmavad difuuset lihasnõrkust, üldist lihaskiudude atroofiat või nekroosi koos kõrgeenenud kreatiinkinaasi tasemega veres ja rabdomüolüüsiga. Taastumisprotsess on sellistel juhtudel pikaajaline. Seerumi lihasensüümide tase on normaalne või natukene suurenenud, põhiliselt on mõjutatud kreatiinkinaasi tase (Owczarek et al., 2005).

1.2 Glükokortikoidide selektiivne mõju

Glükokortikoidsest müopaatiaast tulenevat skeetilihaste nõrkust põhjustavad müofibrillaaraparaadi kahjustused ja muutused neuromuskulaarsetes sünapsites, eriti glükolüütilistes lihaskiududes. Täpselt ei ole teada, kuidas glükokortikoidide kompleksne kataboolne mõju, eriti kontraktiilvalkude, sealhulgas müosiini raskete ahelate (MHC) isovormide selektiivne degradatsioon skeetilihastes realiseerub. Samas on teada, et skeetilihaste rakusiseste valkude degradatsioon toimub läbi lüsoosomaalse ja mittelüsoosomaalse raja. Kuna lüsoosoomide sisaldus skeetilihastes, eriti glükolüütilistes lihaskiududes on madal siis on mittelüsoosomaalsel rajal oluline osa müofibrillaarsete valkude katabolismis ning nende katabolismi kiiruses. Samal ajal väheneb kontraktiilvalkude sünteesi kiirus, eriti glükolüütilistes lihaskiududes. Glükokortikoidide manustamisel on pärssiv mõju MHC sünteesile, samas ei pruugi MHC süntees peegeldada MHC erinevate isovormide sünteesi taset, nagu ka üldine lihasvalkude sünteesi muutus kindlate lihasvalkude sünteesi muutusi kajastada. Müopaatilises *m. soleus*'es ei muutu MHC I isovormi (Wistar liini rottidel sisaldus ~ 99%) sünteesi tase, samuti ei muutu *m. plantaris*'es MHC I isovormi (Wistar liini rottidel sisaldus ~ 5%) sünteesi tase. Müopaatilistes lihastes väheneb II tüüpi MHC isovormide sünteesi tase

(Seene et al., 2003). MHC IIb isovormi suhtelise sisalduse oluline langus ja MHC IId isovormi tõus müopaatilises glükolüütilises lihases kinnitab kvalitatiivset ümberkorralduse protsessi glükolüütilistes lihastes glükokortikoidide ülekülluse korral (Kaasik et al., 2012b).

Seene ja Viru (1982) uuringus vähenes deksametasooniga mõjustatud rottide kehakaal 25% ning *m. quadriceps femoris*'e kaal 29% sealhulgas glükolüütiliste lihaskiudude mass 48%. Selline lihasmassi langus oli kooskõlas müofibrillaarsete aluseliste proteaaside aktiivsusega (Seene ja Viru 1982).

Kirjanduse andmetel on MHC tundlikumad aluselistele proteaasidele, kui müosiini kerged ahelad (MLC) *in vitro* keskkonnas, samas glükokortikoidide manustamine suurendab aluseliste proteaaside aktiivsust skeetilihastes. Aluselisi proteaase sünteesitakse nuumrakkudes, peale degranulatsiooni siseneb ensüüm lihaskiudu. Suurte dooside glükokortikoidide manustamisel tõuseb nuumrakkude arv lihaskiu sidekoelise osa perivaskulaarsetes poorides (Seene et al., 2003). Nuumrakkude degranulatsioon on selgelt avaldunud glükolüütiliste lihaskiudude ümber, samas on nuumrakkude arv lümfisõlmede säsis märkimisväärselt vähenenud. Tõenäoliselt on lihaste nuumrakkude allikaks lümfisõlmed, mis viitab nuumrakkude migratsioonile lümfisõlmedest (Kaasik 2004). Müopaatilises lihases, kus aluseliste proteaaside aktiivsus on suur, eralduvad glükolüütilised kiud naaberkiududest ning võivad lõppresultaadina laguneda. Erinevate metaboolsete ja kontraktilsete omadustega lihaste müofibrillaarvalkude fraktsiooni inkubatsioonis aluseliste proteaasidega rikastatud keskkonnas ilmneb, et MHC IIb isovormide tundlikus sõltub teatud määral lihase karakteristikutest. Kiiretes lihaskiududes, mille oksüdatiivne potentsiaal on madalam on MHC IIb isovormide tundlikkus aluseliste proteaaside suhtes kõrgem. Arvestades MHC isovormide sünteesi taset ja nende tundlikkust aluseliste proteaaside suhtes on MHC isovormide suhtelise sisalduse muutus erinevates lihastes loogiline. MHC IIb isovormi sünteesi tase langeb skeetilihastes, mille oksüdatiivne potentsiaal on madal. Samas suureneb MHC IIb isovormi tundlikkus aluseliste proteaaside suhtes. Selle tulemusena langeb MHC IIb isovormi suhteline sisaldus müopaatilises lihases, MHC IIa ja IId isovormi suhteline sisaldus tõuseb ja lihase kontraktilsed karakteristikud muutuvad (Seene et al., 2003). Kaasik (2004) leidis, et *m. Plantaris*'e MHC IIb isovormi sisaldus langes aluseliste proteaaside toimele $9 \pm 0,9\%$.

1.3 Glükokortikoidsete hormoonide antianaboolne mõju

Glükokortikoidide antianaboolne mõju skeletilihaskoele avaldub mitme erineva mehhanismi tulemusena. Esiteks, glükokortikoidid inhibeervad aminohapete transporti lihastesse, mis võib piirata valgusünteesi. Teiseks, glükokortikoidid pidurdavad insuliini, insuliini sarnane kasvufaktor I (IGF-I) ja aminohapete (eriti leutsiini) stimuleerivat mõju valgusünteesis olulistele mRNA translatsiooni algatavatele faktoritele ning inhibeervad IGF-I anaboolset rolli valgusünteesi regulatsioonis (Schakman et al., 2008). Glükokortikoidsete hormoonpreparaatide manustamine langetab ka testosterooni kontsentratsiooni veres (Reid et al., 1996), mis on valgusünteesi aktiivsust pärssivaks faktoriks. Lisaks on leitud, et glükokortikoidid indutseerivad lihasatroofiat inhibeerides müogeneesi läbi skeletilihaskoe kasvu stimuleeriva faktori müogeeni regulatsiooni, mille tulemusena on häiritud differentseerumisprotsesside kulgemine regenereerivas skeletilihaskoes (Schakman et al., 2008).

1.4 Glükortikoidide kataboolne mõju

Lihase proteolüüs läbi ubikvitiini – proteasoomi süsteemi on olulise rolliga glükokortikoidide kataboolses mõjus. Glükokortikoidide stimulatsiooni ubikvitiini – proteasoomi süsteemile vahendavad läbi kasvanud ekspressiooni mitmed atrogeenid, näiteks atrogin-1 ja MuRF-1. Glükokortikoidide stimulaatorne mõju proteolüüsile toimib läbi ubikvitiini-proteasoomi süsteemi, lüsoosomaalse süsteemi ja kaltsiumist-sõltuva süsteemi. Glükokortikoidid põhjustavad peamiselt müofibrillaarsete valkude degradatsiooni (Singleton et al., 2008). Müofibrillaarsete valkude degradatsiooni kinnitab suurenenud 3-metüülhistidiini eritus glükokortikoidide manustamisel (Kaasik 2004). Valkude degradatsiooni aktiveerimiseks stimuleerivad glükokortikoidid mitme ubikvitiini-proteasoomi süsteemi komponendi ekspressiooni, mis on seotud ubikvitiini konjugeerimisega degradeeruvasse valku, konjugeeriva ensüümiga, atrogin-1 ja MuRF-1, kahe lihas-spetsiifilise ubikvitiini ligaasiga või vastutavad valgu degradatsiooni eest otse läbi proteasoomi. Selline geeni transkriptsiooni aktivatsioon on seotud suurenenud valgu ubikvitiinimisega ja proteasoomi suurenenud proteolüütilise aktiivsusega. Kasutades erinevate proteolüütiliste radade blokeerijaid on leitud, et glükokortikoidid stimuleerivad lisaks ubikvitiini-proteasoomi süsteemist sõltuvale proteolüüsile ka kaltsiumist sõltuvat ja lüsoosomaalset valgu lagundamist. Lüsoosomaalse süsteemi glükokortikoidset atroofset mõju kinnitab ka suurenenud katepsiin L ekspressioon glükokortikoididega mõjustatud loomade lihastes. Kuna proteasoom ei lagunda tervet müofibrilli, siis võib eeldada, et aktiin ja müosiin

peavad olema lahutatud müofibrillist, tõenäoliselt kalpapiinide poolt enne, kui neid saab lagundada ubikvitiin-proteasoom süsteemis (Schakman et al., 2008; Schakman et al., 2013).

1.5 Müopaatia kujunemise dünaamika glükokortikoidide lühiajalisel manustamisel

Minetto ja teised (2015) manustasid suukaudselt tervetele meessoost uuringus osalejatele 7 päeva jooksul deksametasooni 8 mg/päevas ning tuvastasid, et lühiajaline kliiniliste dooside piiridesse jääv glükokortikoidide manustamine vähendab valgusünteesi, suurendab valgu degradatsiooni ja halvab mitokondriaalset funktsiooni ning vähendab lihaskiu ristlõikepindala ja müosiini kontsentratsiooni lihases. Manustamise järgne langenud lihasvalkude tsirkulatsioon viitab glükokortikoidide antianaboolsele mõjule, langenud oli ka kreatiinkinaasi ja müoglobiini tase võrreldes algtasemega. Müoglobiini taseme väiksem langus võrreldes kreatiinkinaasiga võib peegeldada valgusünteesi suuremat langust kiiretes kiududes, mis omavad suuremat kreatiinkinaasi sisaldust, samas müoglobiini on enam aeglastes kiududes. Müostatiini ekspressioon ei suurenenud lühiajalise glükokortikoidide manustamise tulemusel (Minetto et al., 2015).

Macedo ja teiste (2015) uuringus süstiti isastele täiskasvanud Wistar liini rottidele kõhuõõnde deksametasooni 50 µg/ 100g kehakaalu kohta (n=40) (1, 3, 5, 7 või 10 päeva) ja kontrollloomadele (n=42) sama kogus füsioloogilist lahust. Rasva ja mineraalainete vaba mass langes deksametasooniga mõjustatud grupis oluliselt alates kolmandast päevast peale süstimise algust (3, 5, 7 ja 10 päeval vastavalt 12%, 22%, 23% ja 28% võrreldes kontrollgrupiga). Kehamass langes deksametasooniga mõjustatud grupis oluliselt võrreldes kontrollgrupiga alates viiendast päevast (5, 7 ja 10 päeval vastavalt 18%, 21% ja 27%). *M. tibialis anterior*'i müostatiini tase oli viiendal päeval mõjustatud grupis 37% kõrgem võrreldes kontrollgrupiga, kuid langes kümnendaks päevaks algtasemele. MuRF-1 (*muscle ring finger protein 1*) tase tõusis seitsmendaks päevaks 44% kontrollgrupi suhtes ning jäi kõrgendatud tasemele ka kümnendaks päevaks (36% võrreldes kontrollgrupiga). *M. Soleus*'es ei muutunud müostatiini ega MuRF-1 tase võrreldes kontrollgrupiga. Samuti ei muutunud *m. soleus*'e mass kümne päevase mõjustamise tulemusena, kuid *m. tibialis anterior*'i mass langes kümnendaks päevaks 23% võrreldes kontrollgrupiga. Need tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega, mis on näidanud glükokortikoidide erinevat mõju glükolüütilistele ja oksüdatiivsetele lihaskiududele (Macedo et al., 2015).

1.6 Glükokortikoidide mõju inhibeerimine

Umeki ja teiste (2015) poolt läbiviidud uuringus leiti, et deksametasooni manustamine koos klenbuterooliga vähendas deksametasooni poolt esilekutsutavat lihasatroofiat, inhibeerides samaaegselt MHC isovormide üleminekut kiirelt aeglasele. Akt/mTOR raja aktiveerimine oli deksametasooniga mõjustatud grupis oluliselt suuremal määral inhibeeritud võrreldes klenbuterooli ja deksametasooniga mõjustatud grupi ja kontrollgrupiga. Deksametasoon supresseeris ka IGF-I ekspressiooni, kuid klenbuterool nõrgestas seda mõju. Müostatiini ekspressioon jäi muutumatuks. Klenbuteroolil puudus mõju Akt/FOXO raja aktivatsioonile. Need tulemused viitavad, et klenbuterool antagoniseerib deksametasooni poolt esilekutsutavat lihasatroofiat ja MHC isovormide nihet kiirelt aeglasele mõjutades Akt/mTOR signaalraja aktiivsust ja IGF-I ekspressiooni (Umeki et al., 2015).

Hickson ja teised (1981) tuvastasid, et kehaline aktiivsus võib pidurdada glükokortikoidide manustamisest tingitud lihasatroofiat. Nad kastreerisid või võltsopereerisid 65 päeva vanuseid rotte ning jagasid seejärel loomad treening- või inaktiivsesse gruppi. Treeninguid viidi läbi jooksulindil viiel päeval nädalas, 12 nädala jooksul. Viimasel 10 treeningpäeval süstiti katseloomadele naha alla kortisoonatsetaati (100 mg/kg) või 1% karboksüülmetüülselluloosi. Kehamass langes ligikaudu 25% kõigis gruppides, kellele manustati kortisoonatsetaati. *M. plantaris*'e ja *m. gastrocnemius*'e massid, kus domineerivad glükolüütilised lihaskiud, olid ligikaudu 35% madalamad kortisoonatsetaadiga mõjustatud loomadel võrreldes vastavalt kortisooni vabade inaktiivsete võltsopereeritud ja kastreeritud loomadega. Kehaline aktiivsus vähendas 25 - 50% lihasmassi kadu võltsopereeritud ja kastreeritud loomadel võrreldes vastavate inaktiivsete loomadega. *M. plantaris*'es oli mõlema kortisoonatsetaadiga mõjustatud grupi (kastreeritud ja võltsopereeritud) valgu kontsentratsioon ja tsitraadi süntaasi aktiivsus sarnased, kuid valgu kogused lihase massi suhtes vähenesid proportsionaalselt atroofiaga. Samas müoglobiini kontsentratsioon suurenes *m. plantaris*'s kortisoonatsetaadiga mõjustatud loomadel, kuigi absoluutne müoglobiini kogus lihase massi kohta langes. Müoglobiini tase suurenes *m. plantaris*'es mõlemal, nii treeninggrupil, kui kortisoonatsetaadiga mõjustatud grupil, kuid tsitraadi süntaasi aktiivsus suurenes ainult treeningu tulemusena. Need tulemused näitavad, et kehaline aktiivsus võib pidurdada glükokortikoidset lihasatroofiat (Hickson et al., 1981). Sama leidsid ka Seene ja Viru (1982) kelle uuringus langes deksametasooniga mõjustatud kehaliselt aktiivsete rottide *m. quadriceps femoris*'e mass 16%, inaktiivsetele loomadel 29%. Samas leidsid nad, et ainult mõõdukas kehaline aktiivsus omab antikataboolset mõju skeetilihastes ning kurnav treening vastupidi suurendab kataboolset mõju. (Seene ja Viru 1982).

Van den Beukel ja teised (2015) leidsid, et glükokortikoididega mõjustatud hiirte viimine külma keskkonda (+4 °C) 24 tunniks vähendas plasma triglütseriidide kontsentratsiooni ning see mõju kestis veel 24 tundi peale külma mõjustuse lõppu. Külma mõjustus vähendas küll maksa VLDL-TG sekretsiooni, kuid sekretsiooni tase jäi siiski oluliselt kõrgemaks kortikosterooniga ja külmaga mõjustatud hiirtel võrreldes kontrollgrupiga (van den Beukel et al., 2015).

2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED

Uurimistöö eesmärgiks oli välja selgitada skeletilihaskoe müopaatia kujunemise eripärad ja müopaatilise skeletilihaskoe taastumise dünaamika.

Töö eesmärgi täitmiseks seati järgmised ülesanded:

1. Selgitada müopaatilise protsessi kulgemise eripärasid erineva kontraktiilse iseloomuga skeletilihastes.
2. Selgitada müopaatilise seisundi ulatust lihase ja lihaskiudude ristlõikepindalade muutuste tasemel.
3. Selgitada glükokortikoidsete hormoonide poolt tingitud müopaatia foonil skeletilihaskoe regeneratiivset dünaamikat.

3. METOODIKA

3.1 Katseloomad

Eksperimendis kasutati täiskasvanud emaseid Wistar liini rotte (n=20). Katseloomad jaotati 4 gruppi: glükokortikoididega mõjustatud (GC), glükokortikoididega mõjustatud + taastunud grupid (GC-T 10 päeva ja GC-T 20 päeva) ja kontrollgrupp (K). Igas grupis oli 5 looma.

Kogu eksperimendi vältel säilitati kõigil loomadel identsed keskkonnatingimused. Loomad olid ühesugusel dieedil (R70, Laktamin, Stockholm, Sweden) ja toitu ning vett said katseloomad *ad libitum*. Eksperimendi algul fikseeriti kõikide katseloomade kehamass ning katse käigus kaaluti loomi iga päev kuni ohverdamiseni. Vivaariumi temperatuur oli 21 °C ning valguse/pimeduse tsüklil reguleeritud (12/12 tundi). Eksperimendid viidi läbi vastavalt Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi loomkatsete läbiviimise komisjoni loale nr. 48 7.02.2006

3.2 Deksametasooni manustamine

Deksametasoon (Dexafort 3 mg/ml; International B.V. Boxmeer, Netherlands) lahjendati 0,15 M NaCl kontsentratsioonini 500 µg/ml. Kõikidele GC, GC-T 10 päeva ja GC-T 20 päeva gruppide loomadele süstiti kõhuõõnde 50 µg deksametasooni 100 g kehamassi kohta kümne päeva vältel. K grupi loomadele manustati vastav kogus 0,15 M NaCl. Kuna eksperimendi eesmärgiks oli uurida loomade taastumist pärast glükokortikoidse müopaatia esilekutsumist, vähendati deksametasooni doosi antud töös 100 µg/100 g kehamassi kohta (Kaasik et al., 2000) 50 µg/100 g kehamassi kohta vältimaks katseloomade väljalangemist.

K, GC ja GC-T (10 päeva ja 20 päeva) grupi loomad ohverdati ketamiini (Bioketan Vetoquinol Biovert Sp. Zo.o.) ja ksülaasiini (Xylapan Vetoquinol Biowert Sp. Z o.o.) üledoosiga.

Lihased eemaldati, puhastati, kaaluti ning säilitati -80° C juures edaspidisteks analüüsideks.

3.3 Histoloogilised uuringud

Histokeemiliseks analüüsiks kasutati uuritavate gruppide loomade *m. plantaris*'e ekvatoriaalset osa. Selleks lõigati pärast lihase eemaldamist ja kaalumist lihase keskosast umbes 5 mm paksune koeproov ja fikseeriti korgil, kasutades külmutatud koepreparaatidele mõeldud kinnistit Tissue Tek O.C.T. Compound (USA). Seejärel külmutati preparaate, eelnevalt vedelas lämmastikus jahutatud isopentaanis ning säilitati edasise uurimiseni -80 °C juures. Preparaatidelt lõigati 10 µm paksused järjestikused lõigud -20 °C juures külmutusmikrotoomil (Cryo-Star HM 560, MICROM International GmbH, Germany). *M. plantaris*'e rakulise struktuuri terviklikkust hinnati valgusmikroskoobis (suurendus 200x).

Kiutüübi ja ristlõikepindala ning tuumade arvu samaaegseks määramiseks kasutati alternatiivset histokeemilist meetodit (Sakkas et al., 2003), mis ühendab kahte tehnikat: erinevat tüüpi lihaskiudude identifitseerimist ja ristlõikepindala määramist müosiini ATP-asse aktiivsuse alusel pärast eelinkubatsiooni kas happelises (pH 4,3) või aluselises (pH 10,2) keskkonnas (Brooke & Kaiser, 1970) ja tuumade värvimist hematoksüliiniga.

Preparaatide analüüsil kasutati valgusmikroskoopi (Olympus BX-41), koos spetsiaalse kõrglahutusega digitaalse kaamera (Color view IIIu) kasutades 200x, 400x ja 1000x suurendusi ning analüüsi tarkvara (Cell' A Olympus, Soft Imaging System GmbH, Germany). Analüüsiti K ja GC grupi kohta vastavalt 3152 ja 3137 lihaskiu ristlõikepindala ning loendati 180 lihaskiu tuumade arv.

3.4 Müofibrillaarvalkude eraldamine ja MHC isovormilise kompositsiooni määramine

Müofibrillaarvalgud eraldati ja MHC isovormiline kompositsioon määrati K, GC ja GC-T 20 päeva grupi loomade *m. plantaris*'es. Müofibrillaarvalgud eraldati kaheastmeliselt nagu varem kirjeldatud (Seene et al., 2005) ja valgu kontsentratsioon proovis määrati Bradfordi (1976) järgi. Proovidele lisati võrdne maht glütserooli ning säilitati müosiini raskete ahelate (MHC) isovormilise kompositsiooni määramiseks -80° C juures. MHC isovormid lahutati SDS-PAAG-il Mizunoya ja kaasautorite metoodika järgi (Mizunoya et al., 2008). Akrüülamiidi kontsentratsioonid lahutavas ja kontsentreerivas geelis olid vastavalt 8% ja 4%, lahutav geel sisaldas 30% glütserooli. Uuritavad proovid lahjendati valgu kontsentratsioonini 0,1 µg/ml Laemmli proovi puhvriga (Laemmli, 1970), rajale kanti 0,3-0,5 µg müofibrillaarvalku.

Elektroforeesi tingimused: 1h 10 mA ja seejärel 24 h 100 V, +4° C (Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad, USA). Pärast elektroforeesi geelid fikseeriti 50% etanoolis.

Geelid värviti hõbedaga vastavalt Oakley ja kaasautorite (Oakley et al., 1980) metoodikale. Identifitseeriti 4 valgubändi: MHC I, MHC IIa, MHC IIb/x, MHC IIb. Geelide pildistamiseks ja dokumenteerimiseks kasutati seadet G:box BioImaging Systems (Syngene, UK) ja programmi GeneSnap (Syngene, UK), MHC isovormide analüüsimiseks programmi GeneTools (Syngene, UK). Määrati erinevate MHC isovormiline kompositsioon.

3.5 Statistika

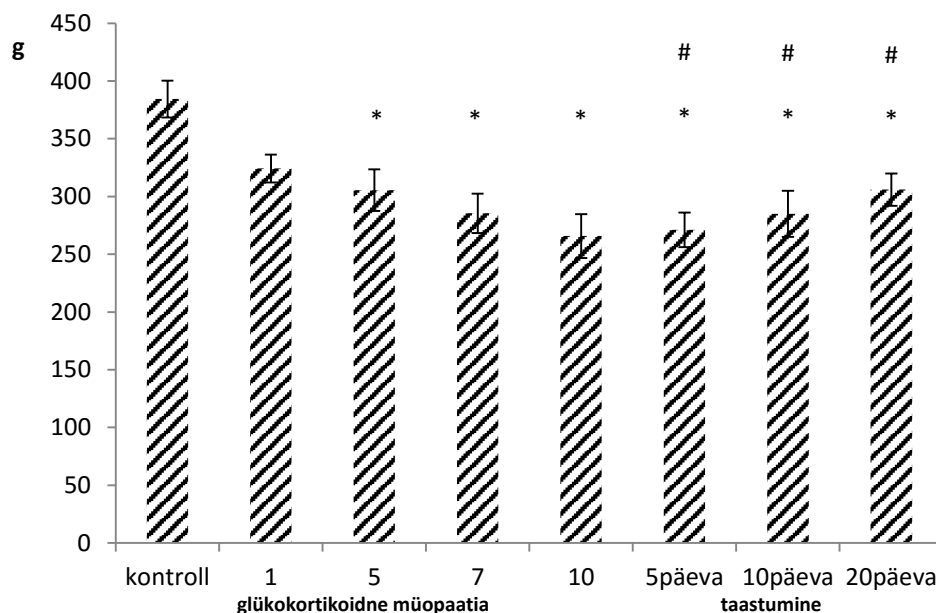
Keskväärtused ja keskväärtuste standardvead arvutati individuaalsetest väärtustest standard protseduuridega. Gruppide keskmiste väärtuste erinevuse hindamiseks kasutati Student'i t-testi ning erinevused loeti oluliseks, kui $p < 0,05$. Tendents loeti oluliseks, kui $p < 0,1$.

Ristlõikepindalade jaotuse muutuste statistilist usaldusväärsust hinnati χ^2 testi alusel.

4. TÖÖ TULEMUSED

4.1 Muutused kehamassis glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel ning mõjustamise järgsel taastumisel

Kõikide gruppide keskmine kehamass oli sarnane eksperimendi alguses. Olulist erinevust keskmises kehamassis täheldati alates GC manustamise viiendast päevast ning kümnendal päeval oli kehamass keskmiselt 24% madalam algtasemest. Taastumisel ilmnis oluline muutus kehamassis võrreldes GC manustamise kümnenda päevaga alates viiendast taastumise päevast. Katseloomade kehamass tõusis pärast kümne päevast GC mõjustamist 20ndaks taastumise päevaks keskmiselt 10% (joonis 1).



Joonis 1. Kehamassi dünaamika mõjustuse algusest kuni 20ne päevase taastumise lõpuni.

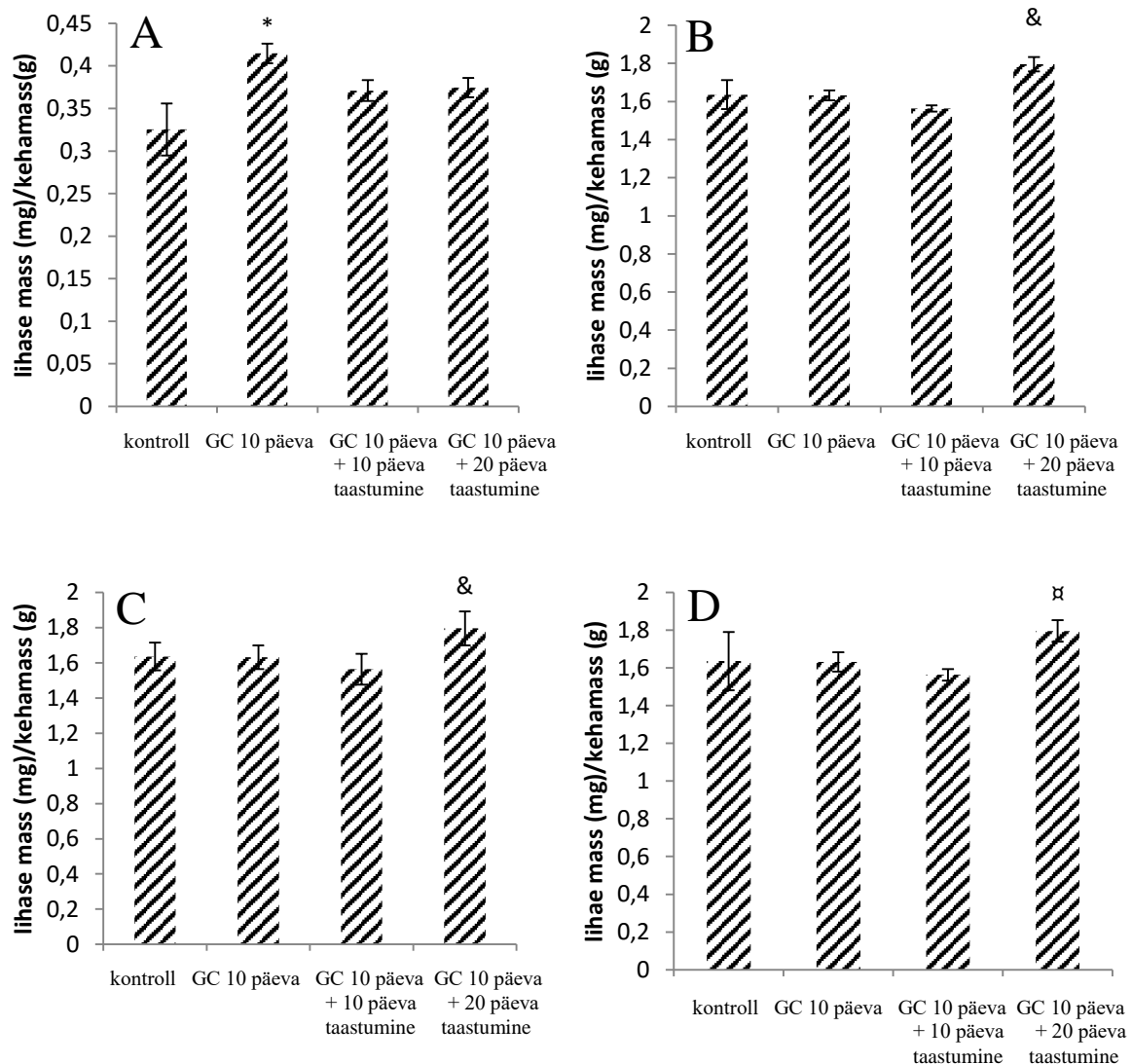
* - $p < 0,05$ võrreldes kontrollgrupiga

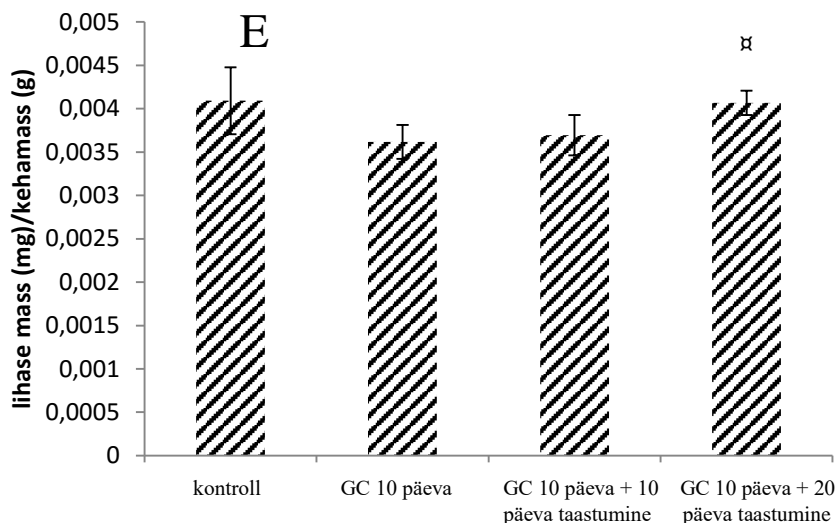
- $p < 0,05$ võrreldes GC manustamise kümnenda päevaga

4.2 Lihase massi ja kehamassi suhte dünaamika glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel ning mõjustusest taastumisel

Andmed lihase massi ja kehamassi suhte osas näitasid, et *m. soleus*'e massi ja kehamassi suhe oli oluliselt kõrgem GC mõjustamise kümnendal päeval (joonis 2A). *M. soleus*'e mass oli 20ndaks taastumise päevaks keskmiselt 93,2% algtasemest. *M. plantaris*'e ja *m. tibialis*

anterior'i massi ja kehamassi suhtes ei ilmnunud gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi (vastavalt joonis 2B ja joonis 2C). *M. plantaris*'e ja *m. tibialis anterior*'i massid olid 20ndal taastumise päeval keskmiselt vastavalt 83,8% ja 88,7% algtasemest. *M. tibialis anterior*'i ja *m. gastrocnemius*'e masside ja kehamassi suhted olid oluliselt kõrgemad taastumise 20ndal päeval võrreldes GC manustamise kümnenda päevaga (vastavalt joonis 2D ja joonis 2E). *M. extensor digitorum longus*'e mass oli keskmiselt 86,1% ja *m. gastrocnemius*'e mass oli keskmiselt 80,3% võrreldes algtasemega.





Joonis 2. Lihaste massi ja kehamassi suhete dünaamika glükokortikoidse hormoonpreparaadiga (GC) mõjustamise ja taastumise ajal.

* - $p < 0,05$ võrreldes kontrollgrupiga

- $p < 0,05$ võrreldes GC mõjustamise kümnenda päevaga,

& - $p < 0,1$ võrreldes GC kümme päeva grupiga.

A – *m. soleus*'e massi ja kehamassi suhe

B – *m. plantaris*'e massi ja kehamassi suhe

C – *m. extensor digitorum longus*'e ja kehamassi suhe

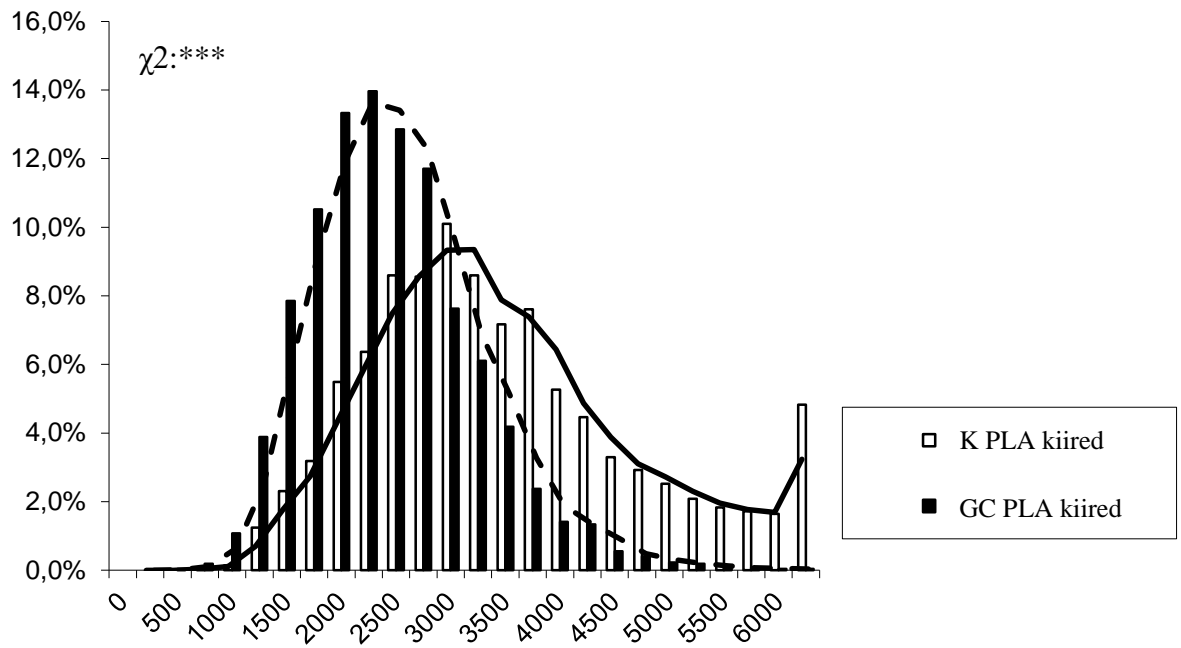
D – *m. tibialis anterior* massi ja kehamassi suhe

E – *m. gastrocnemius*'e massi ja kehamassi suhe

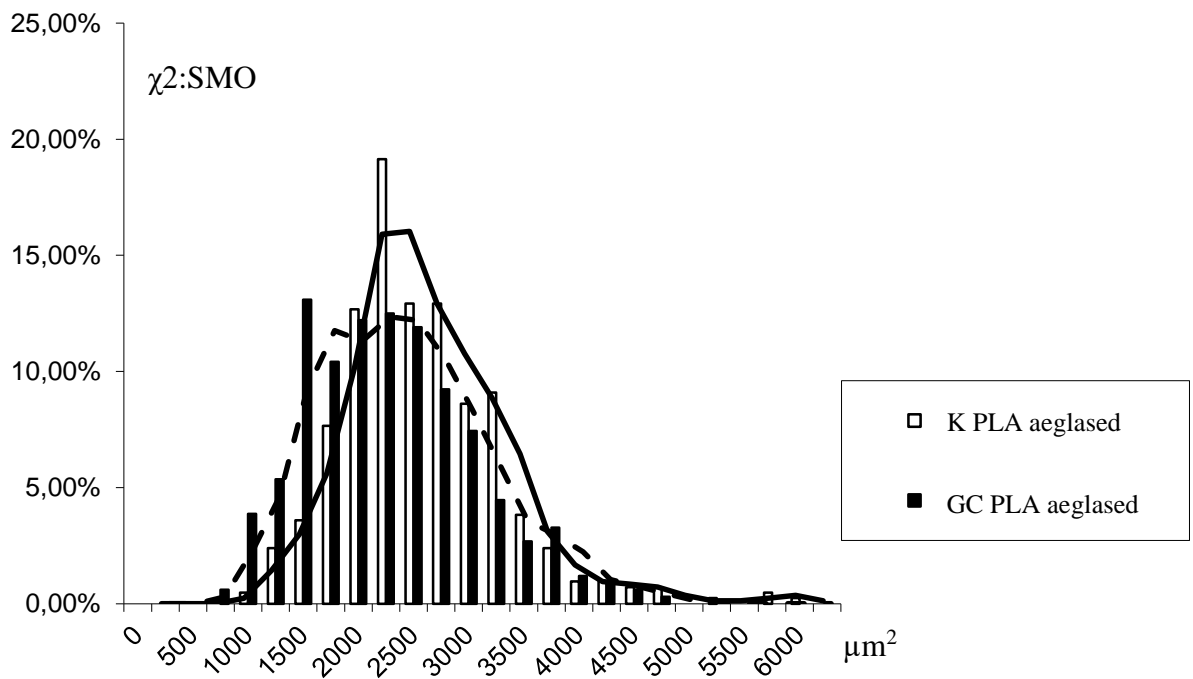
4.3 Lihaskiudude ristlõikepindalade muutused glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamisel

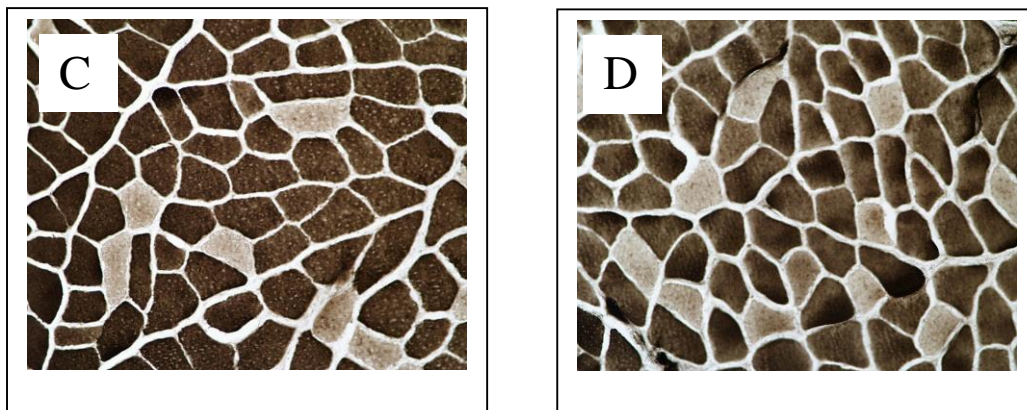
Tulemused *m. plantaris*'e lihaskiudude ristlõikepindalade kohta näitasid, et GC mõjustamisel toimub skeetilihasrakkude tüübi spetsiifiline lihasatroofia. Lihasrakkude ristlõikepindala langeb eelkõige kiirete lihaskiudude populatsioonis, seetõttu toimub kiirete lihaskiudude histogrammis GC mõjustatud grupil nihe väiksema ristlõikepindala suunas (joonis 3A). Aeglaste lihaskiudude graafikus ristlõikepindalade jaotuvuses sellist nihet ei ilmnenu (joonis 3B).

A



B



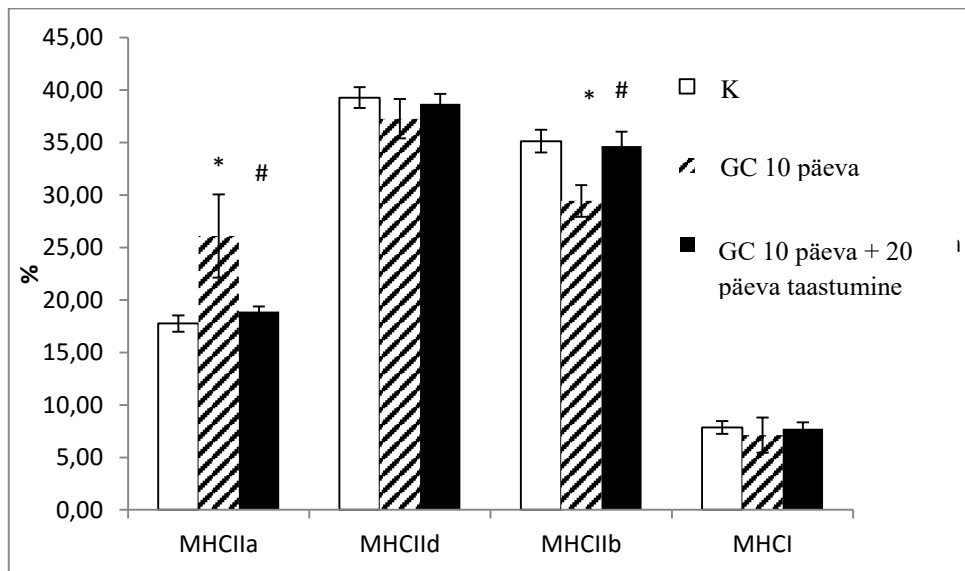


Joonis 3. Lihaskiudude ristlõikepindalade jaotuvus *m. plantaris*'es (PLA).

A – kiirete lihaskiudude ristlõikepindala jaotuvus K (n=2734) ja GC mõjustatud grupil (n=2701), *** $p < 0,01$.
 B – aeglaste lihaskiudude ristlõikepindala jaotuvus K (n=418) ja GC kümme päeva mõjustatud grupil (n=436),
 SMO – statistiliselt mitteoluline. C – K *m. plantaris*'e koepreparaat, pH 10,2, mATP-aasi värving, suurendus 200x, kiired rakud värvunud tumedalt ja aeglased rakud värvunud heledalt. D – GC mõjustatud grupi *m. plantaris*'e koepreparaat, pH 10,2, mATP-aasi värving, suurendus 200x, kiired rakud värvunud tumedalt ja aeglased rakud värvunud heledalt.

4.4 Glükokortikoidsete hormoonidega mõjustamise ja selle järgse taastumise mõju MHC kompositsioonile

Glükokortikoidsete hormoonide manustamine mõjutas tulemuste põhjal MHC isovormide suhtelist sisaldust *m. plantaris*'es. Eksperimentide tulemused näitasid, et MHC IIa isovormi suhteline sisaldus oli GC mõjustamise kümnendal päeval (26%) oluliselt suurem võrreldes kontrollgrupiga (17,8%) ja MHC IIb suhteline sisaldus oli GC mõjustamise kümnendal päeval (29,4%) oluliselt madalam võrreldes kontrollgrupiga (35,1%). MHC IIa isovormi suhteline sisaldus (18,9%) oli oluliselt langenud ja MHC IIb isovormi sisaldus (34,5%) oli oluliselt tõusnud GC mõjustamise ja 20ne päevase taastumise järgselt võrreldes kümne päevase GC mõjustamisega (joonis 4).



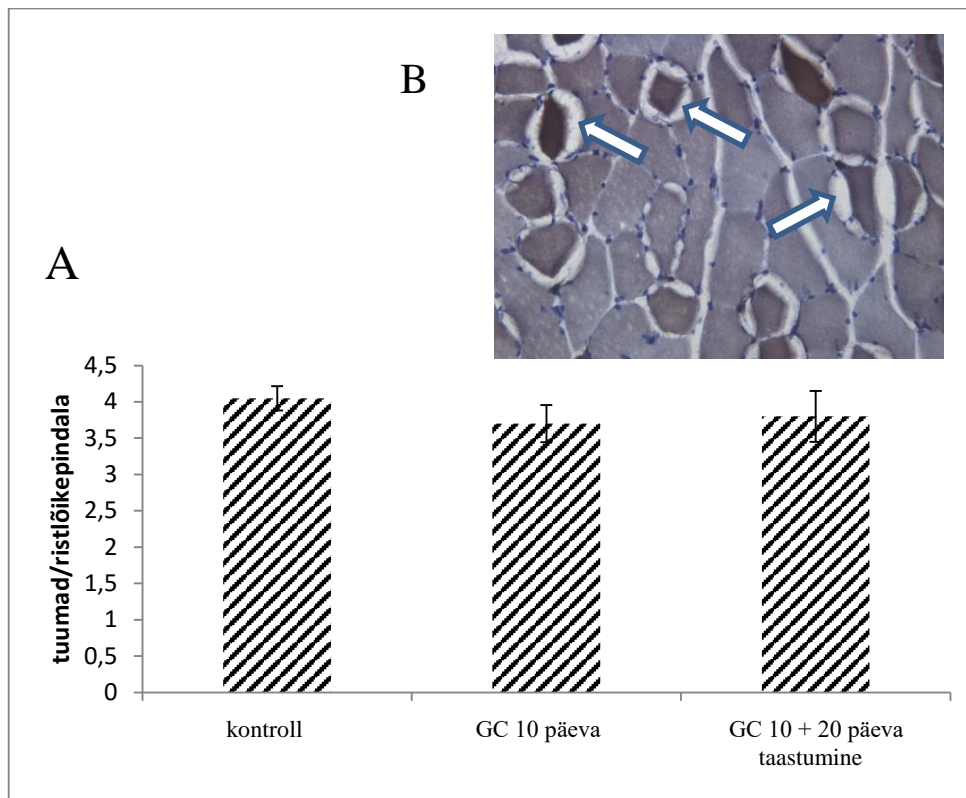
Joonis 4. *M. plantaris*'e MHC isovormilise kompositsiooni muutused GC mõjustamisel ja 20 päevasel taastumisel.

* - $p < 0,05$ võrreldes kontrollgrupiga

- $p < 0,05$ võrreldes GC manustamise kümnenääd päevaga.

4.5 Tuumapopulatsioon glükokortikoidse müopaatia tingimustes

Tulemused näitasid, et lihaskiudude tuumapopulatsioon säilib glükokortikoidse müopaatia tingimustes kontrollloomadega võrreldaval tasemel ning püsib stabiilsena glükokortikoididest põhjustatud müopaatia järgsel taastumise perioodil (joonis 5A). Katsete tulemused näitasid samas, et paralleelselt müopaatiliste protsesside arenguga võib oluliselt kasvada sidekoeliste struktuuride osakaal lihaskiudude vahel. Eksperimentide tulemuste kvalitatiivne analüüs näitas sidekoe poolt hõivatud ruumi olulist suurenemist atrofeerinud lihaskiudude ümber (joonis 5B), mis võib omakorda olla määravaks takistavaks asjaoluks regeneratiivse potentsiaali realiseerimisel nii skeletilihaskoe struktuurset kui funktsionaalset aspektist lähtudes.



Joonis 5. Lihaskiudude (n=180) tuumade ja ristlõikepindalade suhe.

A – kontrollgrupi, GC mõjustatud ja taastumise GC-T 20 päeva gruppide lihaskiudude tuumade arvu ja ristlõikepindalade suhted. B – 10 päeva GC mõjustatud grupi koepreparaat, nooltega tähistatud suurenenud sidekoe hulk.

ARUTELU

Glükokortikoidsete hormoonide, kliinilises praktikas tuntud, kui immuunosupresseerivad ja põletikuvastased ravimid mille pikaajalisel ja kõrgetes doosides manustamisel on märkimisväärsed kõrvalmõjud – sealhulgas kiire iseloomuga (II tüüpi) lihaskiudude atroofia, lihasmassi langus ja jõuvõimete langus (Seene, 1994; Seene et al., 1999).

Meie katsetulemuste põhjal ilmnes oluline katseloomade kehamassi langus viiendal päeval pärast glükokortikoidide kõrgete dooside manustamist. Samal ajal näitasid meie katsete tulemused, et üksikute uuritud skeletilihaste massi langus on proportsionaalne kehamassi langusega, välja arvatud aeglase kontraktiilse iseloomuga skeetilihase puhul (*m. soleus*). Madala oksüdatiivse potentsiaaliga II tüüpi lihaskiud on kirjanduse andmetel glükokortikoidide kataboolsele toimele kõige tundlikumad (Seene & Kaasik, 2016), mille põhjuseks võib olla glükokortikoidsete hormoonide mõjul ulatuslikult tõusnud mittelüsosomaalsete proteaaside, eriti aluseliste proteaaside aktiivsus (Seene & Viru, 1982). Kirjanduse andmed näitavad samuti, et kõrgete glükokortikoidsete hormoonide dooside manustamine langetab testosterooni ja insuliini kontsentratsiooni veres (Tomas, 1982). Uurijad on varasemate uuringute tulemuste alusel üksmeelel, et lihasvalkude sünteesi ekstensiivsel inhibeerimisel on müopaatilise seisundi kujunemisel väiksem roll võrreldes ülesvõimendatud lihasvalkude katabolismiga (Seene, 1994; Löfberg et al., 2002).

Meie andmed tuumapopulatsiooni tasemel näitasid, et lihaskiudude tuumade hulk lihaskiudude ristlõikepindala kohta ei muutunud kõrgete glükokortikoidsete hormoonide dooside manustamisel, mis säilitab meie arvates hea baasi valgusünteesi normaliseerumiseks glükokortikoidide destruktiiivse mõju lõppemisel. Eeltoodud seisukohta toetavad meie tulemused müosiini raskete ahelate isovormide kompositsiooni muutuste kohta, glükokortikoidide manustamisel ja müopaatilisest seisundist taastumisel. Meie katsete tulemused näitasid kiire kontraktiilse iseloomuga skeetilihase (*m. plantaris*) MHC isovormilise kompositsiooni nihet glükokortikoidide toimel suunaga $MHC \rightarrow Iib \rightarrow MHC IId \rightarrow MHC Ila$ ning müopaatia esilekutsumise järgsel taastumisperioodil suunaga $MHC Ila \rightarrow MHC IId \rightarrow MHC Iib$.

Varasemad uuringud on näidanud MHC Iib isovormi suhtelise sisalduse langust uuritud skeetilihastes (Kaasik et al., 2012a), kuid kirjanduses on vähe andmeid MHC isovormide sisalduse ja lihasrakkude ristlõikepindala kohta glükokortikoidsest müopaatiaast taastumisel. Meie katsete tulemused näitasid, et uuritud kiire kontraktiilse iseloomuga skeetilihastes ilmnes tendents skeetilihaste ja katseloomade kehamassi suhte taastumisele 20ndal post-

eksperimentaalsel päeval. Kirjanduse andmed näitavad, et skeletilihaskoe regeneratsiooni dünaamika sõltub lihasmassi tasemest ja regeneratsiooni mehhanismi aluseks olevatest satelliitrakkude arvukusest (Shultz & Darr, 1990).

Meie katsete andmed näitasid et *m. plantaris*'e, *m. extensor digitorum longus*'e, *m. tibialis anterior*'i ja *m. gastrocnemius*'e mass moodustas glükokortikoidide manustamise mõjul kontrolltasemest vastavalt 59,9%, 75,9%, 73,2% ja 64,5%. Kõrge oksüdatiivse potentsiaaliga skeetilihased ja I tüüpi lihaskiud on glükokortikoidsete hormoonide kataboolsele toimele resistentsed, mida autorid on põhjendanud madala proteolüütilise aktiivsusega aeglastes lihastes. Kuna I tüüpi lihastel on oluline roll lihastoonuse ja kehaasendi hoidmisel ning samuti on I tüüpi lihastele iseloomulik funktsionaalne aktiivsus tingimustes, kus kiire iseloomuga lihased on passiivsed, siis eeltoodud funktsionaalsed eripärad võivad samuti selgitada glükokortikoidsete hormoonide nõrgalt väljendunud mõju (Seene et al., 1988).

Kirjanduse andmed näitavad, et glükokortikoidsete hormoonide kõrge tase stimuleerib müostatiini (negatiivse lihasmassi ja kasvu regulatsioonifaktori) produktsiooni (Ma et al., 2003), mis võib inhibeerida skeetilihaste satelliitrakkude proliferatsiooni ja differentseerumist ning seeläbi mõjutada lihaskoe regeneratsiooni- ja taastumisvõimet (McCroskery et al., 2003) ning valgusünteesi intensiivsust (Welle et al., 2006). On ka teada, et skeetilihase satelliitrakkude arvukus ja aktivatsiooni tase on eritüübiliste lihaskiudude puhul erinev (Kadi et al., 2004), mis võib samuti olla üheks regeneratsiooni eripärasid selgitavaks faktoriks.

Meie katsete tulemused näitasid, et glükokortikoidse müopaatia tingimustes suureneb olulisel määral rakuvahelise sidekoe hulk, mis võib viidata ekstratsellulaarse matriksi funktsiooni häirumisele mõjustatud lihastes. Varasemad uuringud on näidanud, et mõõduka iseloomuga funktsionaalne koormus võib olla efektiivne vahend glükokortikoidide mõju pärssimisel ja lihasmassi vähenemisel (Hickson & Davis, 1981; Czerwinski et al., 1987). Meie katsetulemuste põhjal võib spekuloida, et glükokortikoidse müopaatia tingimustes ülemääraselt suurenev ekstratsellulaarne sidekoe hulk on pärssiva iseloomuga funktsionaalse aktiivsuse mõju avaldumise suhtes. Varasemad uuringud on näidanud, et glükokortikoidse müopaatia tingimustes võib aset leida lihaskiudude lõplik destruktsioon mehhaanilise lõhenemise kaudu (Aru, 2008).

Seni avaldatud uuringute tulemused põhinevad valdavalt kõrgete dooside glükokortikoidsete hormoonide kasutamisel müopaatilise protsessi initseeriana. Kõrgete hormoonpreparaadi dooside kasutamisel võib leida aset küll muljetavaldav lihasmassi langus, kuid samal ajal võib toimuda lihase, kui organi regeneratsioonivõime langus, mille oluliseks põhjuseks võib olla suurenenud sidekoe hulk lihaskiudude vahel.

Kirjanduse analüüs näitab, et kõrgete glükokortikoidsete hormoonide dooside manustamise tulemusena areneb katseloomade organismis ulatuslik ja selektiivse iseloomuga müopaatiline seisund. Kirjanduse andmed näitavad samuti, et varasemalt on eksperimentides kasutatud deksametasooni doosideks olnud 100 µg/ 100 g kehamassi kohta, millega on kaasnenud skeletilihaste atroofia kõrval süsteemse iseloomuga kõrvalmõjud, mis võivad spekulatiivselt olla sekundaarseteks lihaskoe seisundit mõjutavateks faktoriteks. Oma eksperimentides kasutasime müopaatia esile kutsumiseks deksametasooni doosi 50 µg / 100 g kehamassi kohta, mis meie tulemuste alusel on piisav kutsumaks esile degeneratiivset protsessi lihaskoes, kuid samal ajal näitavad meie tulemused, et glükokortikoidide destruktiivne mõju ulatub manustamis perioodist kaugemale, mõjutades seeläbi taastumisprotsesside avaldumist ja nende eripärade selgitamist. Manustatava doosiga manipuleerimise kõrval on müopaatia kujunemise protsessis olulisel kohal manustamisperioodi pikkus – varasemates ja meie eksperimentides kümme päeva. Oma tulemustele tuginedes võime spekulatiivselt arvata, et edasiste uuringute kavandamisel võiks kaaluda manustatava hormoonpreparaadi koguse vähendamist ja samal ajal manustamisperioodi lühendamist, mis aitaks leevendada sekundaarsete destruktiivsete mehhanismide rakendumist ning täpsemini selgitada lihaskoe taastumise dünaamikat.

JÄRELDUSED

Töö tulemuste põhjal saame teha järgnevad järeldused:

1. Katseloomade kehamass langeb glükokortikoidsete hormoonide manustamise mõjul alates viiendast hormoonpreparaadiga mõjustamise päevast ning kehamassi taastumine algab viis päeva peale glükokortikoidse hormoonpreparaadi manustamise lõpetamist, kuid jääb 20ne taastumispäeva puhul madalamaks kontrolltasemega võrreldes.
2. Katseloomade lihaste massi ja kehamassi suhe ei muutu glükokortikoidse müopaatia kujunemisprotsesses kiire kontraktiilse iseloomuga lihastes ja tõuseb aeglase kontraktiilse iseloomuga lihastes.
3. Glükokortikoidsete hormoonide poolt tingitud müopaatiast taastumise algfaasis (10 päeva) katseloomade kiire kontraktiilse iseloomuga lihaste massi ja kehamassi suhe ei muutu ja näitab tendentsi tõusule 20ndaks müopaatiast taastumise päevaks.
4. Glükokortikoidsete hormoonide mõjul väheneb lihaskiudude ristlõikepindala kiire kontraktiilse iseloomuga lihase kiiretes lihaskiududes ja ei muutu I tüüpi aeglastes lihaskiududes.
5. Müosiini raskete ahelate kompositsioonis toimub glükokortikoidsete hormoonide manustamisel nihe (MHC IIb → MHC IIc → MHC IIa) kiirelt kompositsioonilt aeglasemale ja 20ne päevase regeneratiivse perioodi jooksul taastub müosiini raskete ahelate isovormide ekspressioon algtasemele.
6. Kümne päevane glükokortikoidsete hormoonide manustamine ei mõjuta lihasraku tuumade arvukust lihaskiudude ristlõikepindala suhtes, kuid suurendab sidekoe hulka lihaskiudude vahel.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Aru M. Relationships between glucocorticoid – caused atrophy and overload: muscle cell morphological characteristics and protein expression. Magistriöö. Tartu: Tartu Ülikooli kehakultuuriteaduskond; 2008.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
3. Brooke MH and Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970; 23:369–379
4. Czerwinski SM, Kurowski TG, O'Neill TM, Hickson RC. Initiating regular exercise protects against muscle atrophy from glucocorticoids. *J Appl Physiol*. 1987; 63:1504–1510.
5. Hickson RC, Davis JR. Partial prevention of glucocorticoid-induced muscle atrophy by endurance training. *Am J Physiol*. 1981; 241:226–232.
6. Kaasik P, Aru M, Alev K, Seene T. Aging and regenerative capacity of skeletal muscle in rats. *Curr Aging Sci*. 2012a; 5:126–130.
7. Kaasik P, Seene T, Umnova M, Alev K The mechanism of action of glycocorticoids in the rat skeletal muscle. *Baltic J Lab Anim Sci*. 2000; 10:185-193
8. Kaasik P, Umnova M, Alev K, Selart A, Seene T. Fine architectonics and protein turnover rate in myofibrils of glucocorticoid caused myopathic rats. *J of Interdiscipl Histopathol*. 2012b; 1:5-10.
9. Kaasik P. Composition and turnover of myofibrillar proteins in volume – overtrained and glucocorticoid caused myopathic skeletal muscle. Doktoritöö. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus; 2004.
10. Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve*. 2004; 29:120–127.
11. Laemmli UK Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-686.
12. Löfberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, et al. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32:345–353.
13. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:363–371.

14. Macedo AG, Krug ALO, Souza LM, Martuscelli AM, Constantino PB, Zago AS, et al. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. *Steroids*. 2016; 107:30–36.
15. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*. 2003; 162:1135–1147.
16. Minetto MA, Qaisar R, Agoni V, Motta G, Longa E, Miotti D, et al. Quantitative and qualitative adaptations of muscle fibers to glucocorticoids. *Muscle Nerve*. 2015; 52:631–639.
17. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1980; 105:361–363.
18. Owczarek J, Jasinka M, Orszulak-Michalak D. Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacol Rep* 2005; 57:23-34.
19. Reid IR, Wattie DJ, Evans MC, Stapleton JP. Testosterone therapy in glucocorticoid-treated men. *Arch Intern Med*. 1996; 156:1173–1177.
20. Sakkas GK, Ball D, Mercer TH, Naish PF. An alternative histochemical method to simultaneously demonstrate muscle nuclei and muscle fibre type. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89:503–505.
21. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 2008; 197:1-10.
22. Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45:2163–2172.
23. Seene T, Alev K, Kaasik P, Pehme A, Parring A. Endurance training: volume-dependent adaptational changes in myosin. *Int J Sports Med* 2005;26:815-821
24. Seene T, Alev K. Effect of glucocorticoids on the turnover rate of actin and myosin heavy and light chains on different types of skeletal muscle fibres. *J. of Steroid Biochem*. 1985; 22:767–771.
25. Seene T, Kaasik P, Pehme A, Alev K, Riso E-M. The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 86:201–206.
26. Seene T, Kaasik P. Role of Myofibrillar Protein Catabolism in Development of Glucocorticoid Myopathy: Aging and Functional Activity Aspects. *Metabolites*. 2016; 6:1-9.
27. Seene T, Umnova M, Alev K, Pehme A. Effect of glucocorticoids on contractile apparatus of rat skeletal muscle. *J Steroid Biochem*. 1988; 29:313–317.

28. Seene T, Viru A. The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibres and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1982; 16:349–352.
29. Seene T. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994; 50:1–4.
30. Seene, T.; Umnova, M.; Kaasik, P. The exercise myopathy. In *Overload, Performance Incompetence, and Regeneration in Sport*; Lehmann, M., Foster, C., Gastmann, U., Keizer, H., Steinacker, J., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY, USA; Boston, MA, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK; Moscow, Russia, 1999;119–130.
31. Shultz, E.; Darr, K. The role of satellite cells in adaptive or induced fiber transformations. In *The Dynamics State of Muscle Fibers*; Pette, D., Ed.; Walter de Gruyter: Berlin, Germany, 1990;667–681.
32. Singleton JR, Baker BL, Thorburn A. Dexamethasone Inhibits Insulin-Like Growth Factor Signaling and Potentiates Myoblast Apoptosis. *J Endocrinol* 2000; 141:2945-2950
33. Tomas FM. Effect of corticosterone on myofibrillar protein turnover in diabetic rats as assessed by Ntau-methylhistidine excretion. *Biochem J*. 1982; 208:593–601.
34. Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Suita K, Fujita T, et al. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0128263.
35. Van den Beukel JC, Boon MR, Steenbergen J, Rensen PCN, Meijer OC, Themmen APN, et al. Cold Exposure Partially Corrects Disturbances in Lipid Metabolism in a Male Mouse Model of Glucocorticoid Excess. *Endocrinology*. 2015; 156:4115–4128.
36. Welle S, Bhatt K, Pinkert CA. Myofibrillar protein synthesis in myostatin-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290:409–415.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Lauri Önnik

(sünnikuupäev: 09.06.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Skeletilihaste taastumise dünaamika glükokortikoidsest müopaatias

mille juhendajateks on Priit Kaasik ja Karin Alev.

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärk kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus

16.05.2016